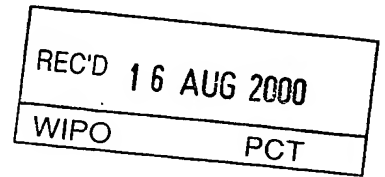


DE00/1944

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



4



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Gebrauchsmusteranmeldung**

Aktenzeichen: 200 05 992.0

Anmeldetag: 04. April 2000

Anmelder/Inhaber: Thomas Roitsch, Regensburg/DE

Bezeichnung: Promotorsystem, dessen Herstellung und Verwendung

IPC: C 12 N, A 01 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Gebrauchsmusteranmeldung.

München, den 18. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust



Promotorsystem, dessen Herstellung und Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf die Genexpression und die Regulation von Genexpression in Pflanzen. Im Speziellen bezieht sich die Erfindung auf DNA-Promotor-Sequenzen, und auf Expressionskassetten, die in Pflanzen eingeführt werden können, um die Transkription einer benachbarten kodierenden Sequenz zeitlich und räumlich innerhalb der Pflanzen zu regulieren. Zusätzlich bezieht sich die Erfindung auf Expressionsvektoren, die solch eine Expressionskassette enthalten und die benutzt werden können, um Pflanzen zu transformieren.

Hintergrund zu der Erfindung

Ein Promotor ist eine DNA-Sequenz, die Expressionsort und -menge eines Gens beeinflusst oder bestimmt, und die Stellen für die Bindung der RNA-Polymerase zur Verfügung stellt. Die Position eines Promotors ist im Genom eines Organismus relativ zum Transkriptionsstartpunkt fixiert. RNA-Polymerase ist ein Enzym, das an den Promotor binden kann und die Transkription eines Gens vollzieht, das unter der Kontrolle dieses Promotors steht. Dabei entsteht die messenger-RNA, die wiederum zur Synthese des Proteines verwendet wird.

Promotoren sind in verschiedenen Organismen untersucht worden. Für bestimmte Spezies konnten konservierte DNA-Bereiche (sog. Consensus-Sequenzen) innerhalb von Promotoren gefunden werden, die mit verschiedenen Genen assoziiert sind. Von diesen Bereichen wird angenommen, daß sie in die Rolle, die der Promotor im Transkriptionsprozeß spielt, eingebunden sind.

Die Initiation des Transkriptionsprozesses in Pflanzen schließt eine Interaktion des Promotors mit der RNA-Polymerase II ein. Innerhalb von Pflanzenpromotoren wurden Consensus-Sequenzen oberhalb des 5'-Endes des Transkriptionsstartpunktes gefunden. Eine dieser Sequenzen ist etwa 7 Basenpaare lang und befindet sich etwa 20-30 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes. Diese Sequenz ist als sog. TATA-box bekannt und es wird angenommen, daß sie eine Rolle bei der RNA-Polymerase Bindung spielt. Eine andere Sequenz mit einer Länge von ungefähr 9 Basenpaaren ist etwa 70-90 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes zu finden. Diese Sequenz wird CAAT-box genannt und es wird angenommen, daß sie in der Regulation des Transkriptionslevels eine Rolle spielt. Es wurden

noch andere Regionen oberhalb des Transkriptionsstartpunktes identifiziert, die die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation in Eukaryonten beeinflussen. Diese DNA-Bereiche, die Enhancer genannt werden, beeinflussen die Aktivität von Promotoren in ihrer Nachbarschaft. Diese Sequenzen sind jedoch der Definition nach keine Promotoren, da ihre Position nicht fixiert sein muß.

Um ein fremdes Gen in einem Organismus, z.B. einer Pflanze, exprimieren zu können, muß die kodierende Sequenz dieses Genes unter die Kontrolle eines Promotors gestellt werden und in die Pflanze eingebracht werden. Zur Insertion des zu exprimierenden Genes in das Pflanzengenom wird die fremde DNA meistens in das Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* gebracht, und dieses wird dann verwendet um die Pflanzen zu transformieren. Eine zweite häufig verwendete Methode ist die direkte Transformation von DNA z.B. mit Hilfe der sogenannten "particle gun". In den meisten Fällen werden hierfür bisher aus Bakterien isolierte Promotoren oder Promotoren von Pflanzenviren verwendet, die zur Expression des fremden Genes in den Pflanzen führen. Diese Promotoren haben den Nachteil, daß sie artfremd sind und daher den Kontrollmechanismen innerhalb der Pflanzen nicht unterliegen.

Bei Verwendung eines pflanzlichen Promotors ist die Expression eines fremden Genes möglich, die somit auch den pflanzlichen Kontrollmechanismen unterliegt. Durch Untersuchungen der Expression des Genes, vor dem der Promotor ursprünglich liegt, lassen sich genaue Kenntnisse über die Expressionsstärke, die Zeit, zu der das Gen exprimiert wird, und den Expressionsort sammeln, die auf die Expression eines fremden Genes, das unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt wird, weitgehend übertragbar sind. Ein weiterer Vorteil ist, daß bei Verwendung eines genau charakterisierten, pflanzlichen Promotors gezielte Eingriffe und Untersuchungen in die Entwicklung bestimmter Pflanzenteile möglich ist.

Im vorliegenden Fall wurde der Promotor einer Invertase aus Tabak kloniert, die in sehr großen Mengen, aber nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium und hochspezifisch, nur in den Antheren exprimiert wird. Zur Klonierung des Promotors wurde eine genomische Bank aus Tabak mit einer Sonde aus dem kodierenden Bereich der untersuchten Invertase durchsucht. Die erhaltenen genomischen DNA-Sequenzen wurden mit molekularbiologischen Methoden weiter charakterisiert und schließlich ein Klon isoliert, der die Promotorsequenz enthielt, die dann sequenziert wurde. Es wurden Expressionskassetten mit verschiedenen Genen hergestellt, die in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht wurden, um Tabakpflanzen damit zu transformieren. Dieses neue Promotorsystem kann nun dazu verwendet werden, fremde Gene in Pflanzen in

3

Ausführungsbeispiele:

1. Die Promotor-DNA-Sequenz, bestehend aus den 4300bp des 5' liegenden DNA-Bereiches, gezählt oberhalb vom Translationsstartpunkt der antherenspezifisch exprimierten Invertase aus Tabak, oder Teile davon, die dadurch gekennzeichnet sind, antherenspezifische Expression für dahinter gelegene Gene zu vermitteln, kann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden so verändert werden, daß Restriktionsschnittstellen am 5'- oder 3'-Ende eingefügt werden.

2. Die wie in 1. veränderte Promotor-DNA-Sequenz oder Teile der Promotor-DNA-Sequenz können zur Herstellung einer Expressionskassette zur Expression fremder Gene in Pflanzen verwendet werden. So eine Expressionskassette ist dadurch gekennzeichnet, daß sie a) die Promotor DNA oder Teile davon aus 1. enthält; b) eine Verbindungs-DNA ohne spezielle Funktion bzw. fremde Gene, verbunden mit der ersten Schnittstelle beinhaltet; und c) eine 3'-Region, bestehend aus der 3'-Region eines eukaryontischen Gens enthält, wobei diese 3'-Region eine zweite Restriktionsschnittstelle an ihrem 5'-Ende besitzt und diese 3'-Region über diese zweite Restriktionsschnittstelle mit der Verbindungs-DNA bzw. den fremden Genen aus b) verbunden ist.

3. Eine Expressionskassette wie in 2. beschrieben, kann in einen Expressionsvektor kloniert werden. Dieser Expressionsvektor kann dazu verwendet werden, mit Hilfe verschiedener gängiger Methoden (z.B. Agrobakterien vermittelte Transformation; direkte Transformation) Pflanzen zu transformieren. Transgene Pflanzen können dann unter Bedingungen angezogen werden, unter denen das fremde Gen unter der transkriptionellen Kontrolle der beschriebenen Promotor-DNA-Sequenz exprimiert wird.

4. Die Promotor-DNA oder Teile davon können dazu verwendet werden, die Translation eines pflanzeigenen Gens zu modulieren. So kann die Expression eines Gens durch Einbringen weiterer Kopien unter der Kontrolle dieses Promotors gesteigert werden oder die Expression kann mit Hilfe der Antisense-Technik unterdrückt werden. Dazu muß die DNA-Sequenz des zu unterdrückenden Gens in "verkehrter Richtung" in eine Expressionskassette wie unter 2. beschrieben kloniert werden und wie unter 3. beschrieben in Pflanzen transformiert werden.

5. Die spezifischen Eigenschaften der Promotor-DNA-Sequenz bzw. von Teilen davon, ermöglichen in transgenen Pflanzen, die wie unter 3. beschrieben hergestellt wurden, eine zeitlich (nur während der Pollenbildung) und räumlich (nur in Antheren) definierte Expression von fremden Genen in Pflanzen.

6. Aufgrund des starken Expressionslevels der antherenspezifischen Invertase in Tabak, lassen sich mit Hilfe dieser Promotor-DNA-Sequenz bzw. mit Teilen davon, in transgenen Pflanzen große Mengen eines bestimmten Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Ort der Pflanze (siehe 5.) herstellen. Dieses Protein kann dann durch Ernten der Antheren, Aufschluß und für das hergestellte Protein spezifische Reinigungsverfahren in großen Mengen gewonnen werden.

7. Die Promotor-DNA-Sequenz, oder Teile davon, können dazu verwendet werden, in die Entwicklung der Antheren in Pflanzen einzugreifen. So können transgene Pflanzen hergestellt werden, bei denen beispielsweise durch Antisense-Expression von Invertasesequenzen die Proteinmengen für die extrazelluläre Invertase verringert werden. Dies führt zu männlich sterilen Pflanzen, die in der Landwirtschaft, bei der Herstellung von Hybridsaatgut von großer Bedeutung sind.

8. Die Verwendung des Promotorsystems zur Herstellung männlich steriler Pflanzen, wie z.B. unter 7. beschrieben kann als Sicherheitssystem bei der Herstellung anderer, kommerziell oder wissenschaftlich nutzbarer transgener Pflanzen verwendet werden. So besteht bei Verwendung männlich steriler Pflanzen nicht die Gefahr des Auskreuzens der genetischen Veränderungen auf Pflanzen die auf benachbarten Feldern oder wild wachsen. Die begrenzte Natur des Eingriffes der zur männlichen Sterilität bei Verwendung dieses Promotorsystems führt stellt einen besonderen Vorteil dar, da nicht in das vegetative Wachstum der Pflanze eingegriffen wird und keine Wechselwirkungen mit den zusätzlich eingebrachten genetischen Veränderungen zu erwarten sind.

9. Die Promotor-DNA-Sequenz, oder Teile davon, können dazu verwendet werden, transgene Pflanzen herzustellen, die pflanzeneigene Stoffe in großer Menge herstellen, die positiv auf ihre

Entwicklung, insbesondere betreffend den Ertrag von fruchttragenden Pflanzen, wirken können. Beispiele für solche pflanzeigene Stoffe wären Wachstumshormone oder Proteine die zur Energieversorgung der wachsenden Gewebe (z.B. Invertasen, Zuckertransporter) notwendig sind.

10. Mit Hilfe des Promotorsystems können transgene Pflanzen hergestellt werden, in denen die Menge der produzierten pflanzeigenen Stoffe (z.B. Wachstumshormone) reduziert werden kann. Diese Reduktion kann durch Einbringen von abbauenden Enzymen, von Inhibitoren oder durch sog. "single-chain" Antikörper erreicht werden.

11. Um Erträge von männlich sterilen, fruchttragenden Pflanzen zu erhalten und zur Vermehrung männlich steriler Pflanzen, die unter Verwendung des Promotorsystems wie z.B. unter 7. beschrieben hergestellt wurden können Restorerstämme hergestellt werden, die nach einer Kreuzung mit den männlich sterilen Stämmen zu fertilen Pflanzen in der F1-Generation führen. Restorerstämme für die unter 7. beschriebenen männlich sterilen Pflanzen könnten Proteine enthalten, die die Kohlenhydratversorgung der Antheren wieder herstellen können, wie z.B. artfremde Invertasen (z.B. aus *Saccharomyces cerevisiae* oder Bakterien), oder Saccharosetransporter in Verbindung mit intrazellulären saccharosespaltenden Enzymen (z.B. Saccharose Synthase, neutrale oder vakuoläre Invertasen).

12. Alternativ zur Herstellung von Restorerstämmen wie unter 11. könnten Pollen von männlich sterilen Pflanzen in einer in vitro Kultivierung zu fertilen Pollen entwickelt werden, mit denen dann eine Befruchtung der transgenen Pflanzen stattfinden kann.

Erreichte Vorteile:

Mit Verwendung dieses Promotorsystems steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem man zeitlich und örtlich gezielt fremde Proteine in Pflanzen exprimieren kann und pflanzeigene Gene in ihrem Expressionslevel modulieren kann.

Ansprüche

1. Promotorsystem, gekennzeichnet durch einen Klon aus genomischen DNA-Sequenzen.
2. Promotorsystem, gekennzeichnet durch Expressionskassetten.
3. Verwendung eines Promotorsystems nach Anspruch 1 oder 2 zum Beeinflussen eines Gens.
4. Verfahren zur Herstellung eines Promotorsystems nach Anspruch 1 oder 2.
5. Verfahren zum Experimentieren mit einem Promotorsystem nach Anspruch 1 oder 2.

Zeichnung 1: Promotor-DNA-Sequenz der extrazellulären Invertase aus Tabak

1	TCTAGAATGA	CGCCACCGGC	CAGGACGGGG	AGTATGATTT	CCCCGAATGT
51	TCGTTCAACT	ncATTGTTAA	AACCTGTTAG	CGTGATGCAG	CCCCGTACTA
101	TCTTATCCTC	GAGTTTCATT	TGTGCAAGTA	CTCGAGGATG	GACAATTCAC
151	GGGCCACTCC	CATCGTCCAC	CATAATGCGT	CTTACATCTG	TATCTAATAT
201	TCGTAAAGTG	ATAACGAGGG	CATCATAGTG	AGGGAAAACC	AAACCGTGGT
251	TATCTGACTT	ATCGAAGATG	ATACTTTCTT	TAAGTTTCTC	GTACCGTTCA
301	TGAGTGATTA	ACTGTTTGAG	CTTGTGGGTT	GTGGCGAACT	TTACGTTGTT
351	GATCGAAACG	TCGTCTCCGC	CCCCGATGAT	AATGTGAATG	GTGCGAGTCG
401	GTAAGGGTGG	TTTCGGCGGT	CCCTGGTGTT	GTTCACGTCC	TCGAGAAAAG
451	TTGGTCCTTC	CTCGGTCACA	CAACAATATT	TTGAGGTGTC	TTGAGTGAAG
501	CATGTCCATG	ACCTCTTGTC	TTAGGGCGAT	ACAATCCTCA	GTTTTGTGAC
551	CTCGCTCTTG	GTGGAACTCG	CAGAGGGCAT	CTGATTTTCT	AGTGCTTGGA
601	TCTGACCTCA	TCTTTTGTGG	CCACTTTACT	TTTGGTCCGA	GCTTCTTCAA
651	TGCATAGACT	ATTTCTGAGG	GTGACACACA	AAATTTGTGA	GCGGATAGTA
701	AAGAGGGCAT	ACCTCTCTCG	TTCCGGTGAG	TCCCTGTCCT	TGGCCTAGAT
751	GGGCCCTCTT	CGTAGCGGGA	GAGGGGCATG	ATGGCACTTT	TGACATATGG
801	TTGATCCATT	TCTCGGTTAG	ATCATGGAGC	TGCAAGATCT	CTCTTGGCAT
851	CATTTTGACG	ATCCTTCCTG	GTTTCGGCTT	GTACCGAGGT	CAATCGATCA
901	GTTGGCCCAT	TCAGGTCGTC	TTCGTCGGCA	CGGGCCTCAG	CACAGTAGGC
951	GTTGTGTATT	TCATCCCAAG	TGGTTGGAGG	ATATTTTATA	AGTTGGTTTA
1001	ACAGTTTTCT	GGTCGCCCTC	GAGCCATTCA	TGTTTCAGCCC	ATTCTGGAAA
1051	GTTGCTACAA	CCATTCCFTC	TGATACATTG	GGTAAGGTCA	TCCTTACTCT
1101	GTTGAATCGA	GCGAGGAAGT	CCCTCAATCC	CTCTCCGAGT	GATTGTTTGA
1151	TGGCAAATAT	ATCGTTCACT	CCTGCCTCCG	CGTTTTTAGC	CCCAACATGG
1201	GCCATTATGA	ACTTGTGCGC	CATCTCTTCG	AATATTTCAA	TGGAGCGCGC
1251	GGGCAGCTGT	GAATACCAAG	TCAATGCTCC	TCCGGTAAGG	GTCTCGCCGA
1301	ACATTTTCAA	CAAGATGGAG	GAGACTTGTT	CTTTGGAGAG	ATCATTGCCC
1351	TTTACCGCAG	TGACATAATG	ATTACATGAT	CTTCGGGGTC	GGTCGTACCA
1401	TCATAAATTT	TCAGATAAGG	TGGCATCTTG	AACGTCTTGG	GTATGGCATA
1451	TGGGGCGGCT	TCATCACTGT	AGGGTTGCTC	GACTAACCGA	CCAGCGTCTC
1501	TTTTTGGAAA	TATTTTGGGG	GCACCCGETA	TTTTATCGAC	TCTTTCTTGG
1551	TGTTCTCTCA	TTTGATCCCG	AAGCATTTTA	TTTTCGTTTT	CCATTTCTTC
1601	CATTTTCTTC	AGAATGGCCG	TGAGGGTGTC	ATTACCTGCA	TTATTAATAT
1651	TGTGAGTGAT	ACCTGTTACT	GAAGGGGGAG	GCTCGTCTCTG	TTTGGTCATT
1701	GCTGGTGCAA	TGCAAGTCCT	TGCAATTTCT	CTAAATACCT	CCTGAGTGGG
1751	TTTGTTGAGG	ATGCCGGTCA	GCATATTTGT	CAGCCAAGCT	TCGAGTAGCT
1801	TCTTCACCGC	TGGTGGCGCC	TCTTCCGTTG	TGGACGTGGA	AGCTCCTTTA
1851	CCGCGGGATG	TTGCGATACT	GCTGTGAGGG	AGGGGTGATC	CACTTCGTCTG
1901	GGGAGAGGGT	TTAGGCGTTA	TGCCTTCGCC	TTCTATTTCTG	GAGACCTCAT
1951	TGATGGTGTT	TAAGAGGTTG	GTAAGTGAGAT	TGGCCACTGC	CTTCATCCTT
2001	TCTTCTCCCT	TACCTGCCAT	GTCAGATCTG	GGTGTAACAAG	GAAGTAGGAG
2051	CTTCTCTTCT	TCTTTTTTGT	GAATTGTGCC	AGTTATAGAT	CTAAAAGAAA
2101	CTAAAGTTTT	AACTAGACTA	TCCTCACAGA	CGGCGCCAAA	TTGTTTGACC
2151	AAAAAATATA	GACTTTTGAT	TAAATTAATT	AATATTGTAT	GACAAAGGAT
2201	TAAACCTAGT	TAATGATAAT	AACCTCAGAT	CTATAATCAA	TTAACAGCAA
2251	TCACGGTCAT	AGCAGCGTTG	AGAGAAGATT	AAATGTGATG	TnCATTC AAT
2301	ATTTCAAGAT	CATTAATGAT	AGGGGAATAT	CAAGCAATAA	ATAACGATAA
2351	ATGGCATTAA	AGTAAATAAG	GAGAATGATT	CACCCAATAT	TGAATGAGGT
2401	GGATGATTCT	TCTTTTTGAC	AATGATGAAT	GATGGnCAAA	TACTAGAATG
2451	TTGGGACCCT	TCTCGGATCT	AATGAAAAAA	GTATGGAATA	GTAATAATC
2501	GAATCTCTTT	AGAAAGGTAG	TGATTGTCTT	TTATCTAGAG	AGAAAGTCTG

2551 CTTTTCAAAG AATATTTTTC TCAGAGAATA TTACATCCCC CTCTCTCCCT
2601 ATnTCTTTT CTATTTATAT GGGACATTCC TCAATCAATC CTAAGGTAC
2651 ATACACCAAG AATATTCAAT AAAATATTTT TTTGAATATT CTATTATAAA
2701 AACTAGCTGT TAGCACTCGA CCTCGGTCGn TATTGACTAC TCGGTTACGA
2751 GCCCCGTGCAT TTAATAATCG ACCTCGATTA CATCACTTTC TACGATACTG
2801 CTTTCATGTCA AATCTTAATG AAAGCAGATT TTGACCCATA CAATAATATG
2851 ACAAATTTGC TTCCAAAGAA AACATGGCTC TTATAGTGAA ATATCGTTAG
2901 ACTGTTATAG AAAGATCTGA ATTTATTTAT AAGAATAGTG TTTTCTTCTT
2951 TTCTTTTCAT ATCTAAGGAG TAAAGCAACC ATGAATAGAA AAGGCTTACT
3001 AACTATATAT CAAAGGAATG GTGTTTTTTC TTTAAATATG GATAAAAATT
3051 TGTGAATATA GAAGATTAGA TCAATTAACA AAGGTTATGG TGGAGTGGTA
3101 AGCAGAGGCG GACCTATGTG TTATAGTAAG GGGTCACCCA CTACTAGAAA
3151 TCCGGTAAAG ATCGATCAA AAACCGACCA ACATTGGTCG GTAATGGCCA
3201 AAAACTGACC AAAACGCGAT CATTACGTCG TGAACGGTAT TTTTATGGTC
3251 GGAAAGGAAT ACCGACCAAA GTTGGTCGGA AATTACCGAC CAACTTTGGT
3301 CGGTCAATTA AATTCAAAAA AAATATTGTA AAAAAAACC GACCAAAGTT
3351 GATCGGTATT TTAATTATGT AATAAAAAGA TCACTATCT GGGAAATCGAA
3401 CCGGGGCTG TACTATGGCA AGTACTATT CTACCACTAG ACCATTGGTT
3451 CATTTTGTIT TAAGACTGTC TTTTATTTGA TTTTACTCT TTAATTATAT
3501 TTTTGCACGA AAATAACCGA CCAAGTTGG TCGATTTTAT TAAAAAGTAA
3551 AATTACTTAC CAAAGTTGGT CGATTTTTTT AAATGATCCG CCGAATTAAC
3601 CGACCAATTT TGGTAGGTTT TTTAATATT AATTTTTATT TATTTTAATT
3651 GAAAACTAA CCAAGTTAG TCGGTTTCTT GAAACATAAA TTTTCGCGGA
3701 CTCAAAAATA GTTTCCTGCA TTTTGCGCC AAAGAAACC GACCAAAGTT
3751 GGTCTGTTTC GTAAAAAATA AAAAAATTTA AAAAAATAT TTTAAAAAC
3801 CGACCAACTT TAGTCGGTTT TTTGGTCGAT TTTTGACCG ACCAAAGTTG
3851 GTCGGTCGAC CTTGGTCGGT TTTTCCGAA TTTCTAGTAG TGACCGAACC
3901 CTGTAAGCTT CCGGAGAAAT TTTGTATATG TATATGTGTA TATCCTTAAA
3951 ATGATTAATT TAAAGAACGn nGCACCCTGA ATACTAGAAG CCTTTAGGGG
4001 CACTAGATGA GCAGAATAAC GTGTTCTCGT CGCGTAAAAA TACTTGGATC
4051 CGCCTATGAT GGTAAGTACT TCTTCGTCTT TAATCAGAGG TTTCTGACTT
4101 GAGCTCCAGA TATAAATAT AGACTCGTCT TTATAGCACC TTTTAATAAG
4151 ACTATGACTT CATCTGATTT CTCTATAAAT ACTCCTCAAG CTTTCGGTTC
4201 TTCCTCATTC TTCAGTTTCT TTCTCCACAT CACAGAAGTG AAAACAAAAC
4251 AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA AAATAAAGAG TTTCTGTCAA ATTAAGTCCA
4301 ATAGGGAAAA TG